金环蛇（*Bungarus fasciatus*）蛇毒类心脏毒素的纯化及生化分析

肖昌华　张洪基
（中国科学院昆明动物研究所）

雷克健
（中国科学院生物物理研究所）

摘　要

金环蛇（*Bungarus fasciatus*）蛇毒经磷酸纤维素P11柱层析分离所得的第8峰（即类心脏毒素），再经磺乙基—葡聚糖凝胶G—25柱层析分离得8A、8B。再将8A、8B分别经葡聚糖凝胶G—50柱层析，得纯化的类心脏毒素A、B。经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一的条带。无酶活性。其氨基酸组成及含量基本与Shiau Lin 1975 等所测定的结果一致。

Shiau Lin 等从金环蛇蛇毒中分离得类心脏毒素A、B两组分，并进行了有关化学及药理学性质的研究。关于金环蛇蛇毒神经毒素及类心脏毒素的结构与功能则还未见到报导。

国内广西医学院等曾对金环蛇粗毒作过一些酶活性测定及抗凝血、镇痛作用的测定，但未见有分离纯化的报导。

由于金环蛇蛇毒中类心脏毒素含量较高（占全毒的40%以上），分子量较小，对热（60°C）2小时不失活，对酸（10%醋酸）稳定，比较易于纯化，同时又是一个生物活性较高的毒蛋白，是研究蛋白质结构与功能的较理想的对象。为此我们对金环蛇蛇毒中的类心脏毒素进行了分离纯化及其生化性质的测定。

材料和方法

金环蛇毒系广西医学院（59年采集）、广州医学院（78年采集）提供的真空干燥粉

本文于1980年1月16日收到。

末。磷酸纤维素P11系英国 Whatman 出品；磺乙基—葡聚糖凝胶G—25系Pharmacia产品；葡聚糖凝胶G—50，上海生物化学研究所东风生化试剂厂出品；其它所用化学试剂均为分析纯。

一、金环蛇毒的柱层析分离：用磷酸纤维素P11柱层析（2 ×70厘米），醋酸钠缓冲液（0.05M，pH4.6），NaCl，0—0.7M 一次直线梯度洗脱将粗毒分离为15个主要蛋白组分，经鉴定（另文报导）峰 8 为类心脏毒素（约占全毒的46%），将峰 8 收集液用冷丙酮（蛋白液：丙酮＝1 ：3）沉淀，抽滤，真空干燥，保存待用。

二、金环蛇毒类心脏毒素的纯化：

1.磺乙基—葡聚糖凝胶柱层析：层析柱（2 ×70厘米），用0.05M醋酸—醋酸钠缓冲液，内含0.2M NaCl，pH 4.8平衡。取金环蛇毒类心脏毒素干粉200毫克溶于平衡缓冲液 5 毫升中上柱；梯度洗脱液：上述醋酸缓冲液含 0.2M NaCl，对含 0.5M NaCl缓冲液梯度洗脱，各取250毫升。

洗脱液用 SF—400L 型自动部分收集器收集，每管 4 毫升，每小时 8 管。收集液用国产751型分光光度计在 280Mμ 下光吸收检测。蛋白峰收集液合并待用或用冷丙酮（蛋白液：丙酮＝1 ：3）沉淀，抽滤，真空干燥待用。

2.葡聚糖凝胶G—50柱层析：层析柱（2 ×70厘米），用10%醋酸溶液平衡及洗脱，样品量80毫克溶于 5 毫升同一溶液中，洗脱液每管 4 毫升，每小时 7 管。收集液。280Mμ下光吸收检测。按图合并主峰冰冻干燥得无盐的类心脏毒素A或类心脏毒素B在

三、类心脏毒素A、类心脏毒素B的纯度鉴定：

1.聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳：参照低pH系统操作。凝胶板为 140×110× 2 毫米^3，分离胶pH4.3，凝胶浓度15%，浓缩胶pH6.7，凝胶浓度 5 %。金环蛇蛇毒1.0毫克溶于15微升pH6.7KOH—醋酸缓冲液中，再加15微升40%蔗糖溶液混匀加样。金环蛇毒类心脏毒素A、类心脏毒素B各取 0.2 毫克按上述方法加样。电极缓冲液为β—丙氨酸—醋酸缓冲液，pH4.5。电流强度20—25毫安，电压150—170伏，电泳 6 — 7 小时。电泳完毕后取下用12.5%三氯乙酸固定，以12.5%三氯乙酸0.05%考马斯亮兰溶液染色 2 小时，用 7 %醋酸溶液脱色，更换 2 — 3 次脱色液即可见到清晰的兰色蛋白色带。

2.酶活性测定：参照（云南省动物研究所第四室，1976）的方法测定了胆碱酯酶、蛋白水解酶、氨基酸氧化酶、磷酯酶A等酶活力。

四、金环蛇毒类心脏毒素A、类心脏毒素B及眼镜蛇毒心脏毒素D的氨基酸组成测定：

各取金环蛇毒类心脏毒素A、类心脏毒素B及眼镜蛇毒心脏毒素D1.0毫克于水解管中，分别加入水解液（20毫克酚，0.12毫升巯基乙酸溶于 4 毫升5.74N 盐酸中）1.0 毫升，抽气封管，于105—110°C水解24小时。启封后真空干燥二次除去HCl供氨基酸测定。

水解液在日立（Hitachi）835型氨基酸分析仪上测定。色氨酸以乙醛酸或二甲氨基苯甲醛显色法，胱氨酸按 Folin 显色法另行测定。

结　果

一、金环蛇蛇毒磷酸纤维素P11柱层析：其结果如图1。

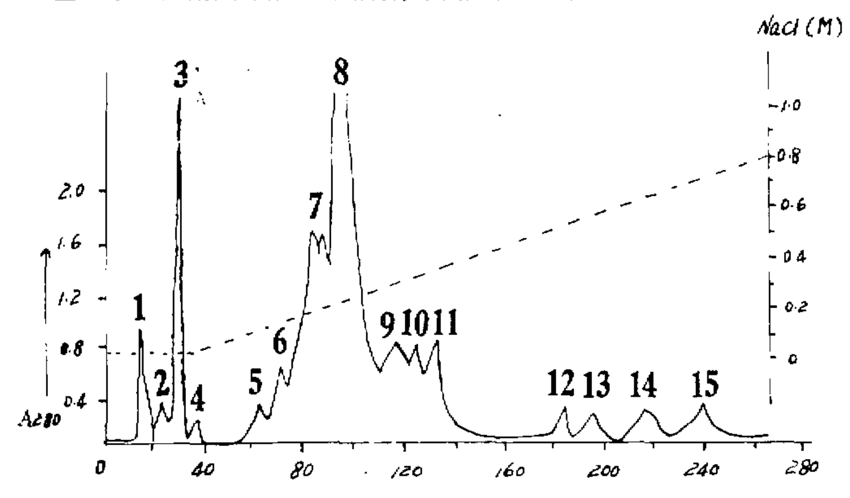


图1　金环蛇蛇毒的磷酸纤维素P11柱层析分离

由图可知将金环蛇毒分离为15个主要蛋白组分，经鉴定（另文报导）峰8为类心脏毒素，峰12、13为类神经毒素。峰8含量为全毒总蛋白量的46%，其LD_{50}为64微克/20克体重小白鼠（腹腔注射），神经毒素LD_{50}为1微克/20克体重（腹腔注射，皮下注射为7.2微克/20克体重），与Shiau Lin等人所得的结果相似。

二、金环蛇毒类心脏毒素经磺乙基—葡聚糖凝胶G—25再分离：其结果如图2。

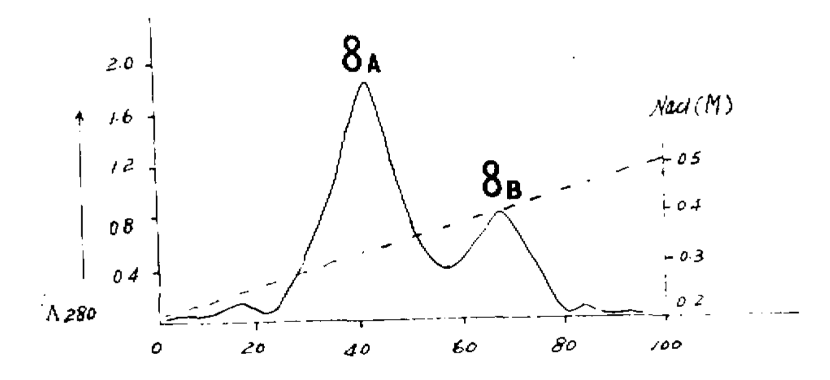


图2　金环蛇蛇毒类心脏毒素(峰8)的磺乙基—葡聚糖凝胶G25柱层析再分离

由图可见峰8可再分离为8A、8B两个主要蛋白峰，8A约占60%，8B约占40%。

根据层析行为的差异，我们称两种金环蛇毒类心脏毒素为类心脏毒素A、类心脏毒素B。

三、葡聚糖凝胶柱层析：类心脏毒素A、类心脏毒素B经葡聚糖凝胶G—50再纯化，结果如图3。

由图可见类心脏毒素A、类心脏毒素B均呈现一个主要对称的蛋白峰。合并主峰，经真空冷冻干燥得无盐纯化的类心脏毒素A、类心脏毒素B冻干粉。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳：

类心脏毒素A、类心脏毒素B均只有单一的蛋白色带，它们是金环蛇毒的主要蛋白成分，它与层析图谱的结果一致。类心脏毒素A比类心脏毒素B电泳速度稍快，即类心脏毒素B的等电点比类心脏毒素A高。

五、酶活力的测定：测定了乙酰胆碱酯酶、蛋白水解酶、L—氨基酸氧化酶，磷酯酶A等酶活力，其结果均为阴性，也即类心脏毒素是无酶活力的毒蛋白。

六、氨基酸组成测定：结果见表1。

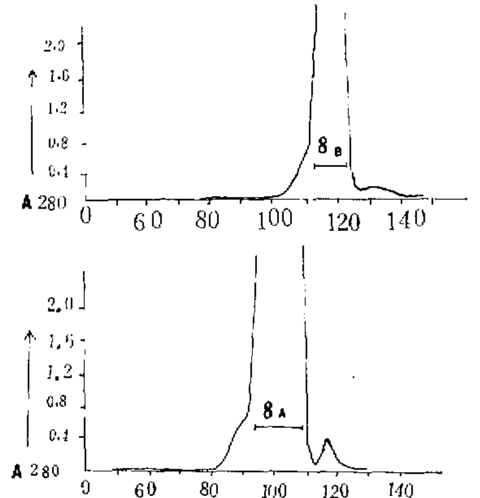


图3 金环蛇毒类心脏毒素A、类心脏毒素B葡聚糖凝胶G—50柱层析层析柱（3 ×110厘米），10%醋酸溶液洗脱。

表1 金环蛇毒类心脏毒素A、B及眼镜蛇毒心脏毒素D的氨基酸组成测定结果

氨基酸名称	类心脏毒素A	类心脏毒素B	眼镜蛇心脏毒素D
Aspartic acid	10	17	6
Threonine	6	8	4
Serine	1	1	3
Glutamic acid	4	7	0
Proline	3	2	7
Glycine	7	10	3
Alanine	7	11	2
Half-Cystine	6	18	8
Valine	2	3	7
Methioine	1	1	2
Isoleucine	3	4	1
Leucine	4	6	6
Tyrosine	6	8	3
Phenylalanine	3	5	2
Lysine	8	15	20
Histidine	2	3	0
Arginine	3	3	3
Tryptophan	1	2	0
Amide NH3	8	9	7
总计	77	124	77
分子量	10056.59	16163.31	10129.02

由表1可知，金环蛇毒类心脏毒素A与类心脏毒素B由相同的18种氨基酸组成，但各种氨基酸的含量则不尽相同。

金环蛇毒类心脏毒素的氨基酸组成与眼镜蛇毒类心脏毒素的相比，后者不含Glu、His、Try。其它氨基酸含量也不尽相同。

本文结果与Shiau Lin等的结果基本一致，个别氨基酸的含量略有差异，特别是Lys的差异较大，本文结果较高。

讨　论

本文采用磷酸纤维素，磺乙基—葡聚糖凝胶柱层提纯金环蛇毒的类心脏毒素较之Shiau Lin等所用的方法有更好的分离效果。纯化后的类心脏毒素A、类心脏毒素B经聚丙烯酰凝胶电泳鉴定为单一的组分，无酶活性，氨基酸组成测定基本与Shiau Lin等的结果一致。但其Lys含量较高。其含量眼镜蛇毒类心脏毒素D＞金环蛇毒类心脏毒素B＞金环蛇毒类心脏毒素A。

尽管金环蛇毒的心脏毒素与眼镜蛇毒心脏毒素在生理功能上有相同的作用，但两者的氨基酸组成有较大的差异，因此我们也同意称之为类心脏毒素(Cardiotoxin-Like)。

参　考　文　献

云南省动物研究所第四室　1976　蛇毒的研究和利用 Ⅰ.我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力的测定。生物化学与生物物理学报。8（2）：151—165。

阿萨契阿尼B．C．著（四川医学院生物化学教研组译）1964 生物化学检查法。人民卫生出版社，130—133。

莽克强等1975聚丙烯酰胺凝胶电泳。科学出版社，32。

Shiau Lin, S. Y., M. C. Huang and C. Y. Lee 1975 A study of cardiotoxic principles from the venom of *Bungarus fasciatus* (Schneider). Toxicon 13, 189—196.

Lo. T. B and H. S. Lu 1979 Toxic components in *Bungarus fasciatus* venom. Toxicon 17, 106.

Study on Venom of *Bungarus fasciatus*, The Purification and Biochemical Analysis of Cardiotoxic Principles

Xiao Changhua, Zhan Hongji

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Lei Kejian

(Institute of Biophysics, Academia sinica,)

Abstract

Fractionation of venom of Bungarus fasciatus was performed on cellulose phosphate pH by column chromatography. Peak VIII (cardiotoxic principles) was further isolated on SE-Sephadex G—25 and divided into VIIIA and VIIIB. Purified cardiotoxic principle A and B were obtained by column chromatography of VIIIA and VIIIB on Sephadex G—50. A single band without enzyme activity was observed by polyacrylamide gel electrophoresis. The contents and composition of amino-acid are similar to those tested by Shiau Lin et al.